

反义寡聚核苷酸抗柯萨奇病毒感染的研究

孙红妹 刘哲伟 张霆

【摘要】 目的 针对柯萨奇病毒-3 型(CVB₃)基因组重要功能区设计系列反义寡聚核苷酸序列, 通过实验观察特异性反义核酸对病毒感染细胞的抑制作用。方法 通过病毒空斑形成试验及致细胞病变作用, 了解反义核酸抑制及阻断 CVB₃ 病毒感染细胞的能力。结果 实验所设计的反义核酸中 S_{CB1} 对感染 HeLa 细胞的 CVB₃ 病毒活性抑制作用较强, 当病毒感染量为 1 MOI 时, 病毒活性抑制率高达 90%。S_{CB4} 和 S_{CB2} 均为 75%。S_{CB6} 有 50% 抑制作用, 而 S_{CB3} 和 S_{CB5} 以及非特异性对照序列对 CVB₃ 病毒基因基本没有任何作用。结论 通过以上实验确定 S_{CB1}、S_{CB2}、S_{CB4} 等较好的抗病毒反义核酸序列, 为进一步研究反义核酸抗病毒作用提供了重要的实验基础。

【关键词】 反义寡聚核苷酸; 柯萨奇病毒; HeLa 细胞

Antisense oligonucleotides resistance to coxsackievirus B₃ infection in HeLa cells SUN Hongmei, LIU Zhewei, ZHANG Ting. Beijing Central Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

【Abstract】 Objective Antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) hold great promise as therapeutic agents for the treatment of many human diseases. Oligonucleotides specifically hybrid with a selected sequence of RNA or DNA and inhibit the flow of genetic information DNA (or RNA) to proteins. In accordance with the present study, several oligonucleotide sequences that targeted CVB₃ RNA coding Vp₄, Vp₂, Vp₁, cleavage enzyme (P2A) or untranslational region were designed for observation. **Methods** Antiviral activities of these oligonucleotides were evaluated by plaque reduction assay and cytopathic effect (CPE). Cells were also treated with random oligonucleotides as a specificity control. **Results** Original ODNs, displaying sequence-specific inhibition ranging from 50% to 90% were identified. Three ODNs (at 5 microM concentration), which targeting at the pyrimidine-rich tract (S_{CB1}), structural protein VP₁ (S_{CB4}) and initiation of translation (S_{CB2}) were shown to exhibit inhibition of viral infection 75% to 90% at 1 MOI. There was only low antiviral activity in S_{CB5} and S_{CB3}, and random oligonucleotide were not found having antiviral activity. Oligonucleotides in this study were not toxic at 5 microM concentration. **Conclusion** A better antiviral antisense oligonucleotides as S_{CB1} and S_{CB4}, S_{CB2}, could provide candidate antisense oligonucleotides for the treatment of CVB₃ infection.

【Key words】 Antisense oligodeoxynucleotides (ODNs); Coxsackievirus; HeLa cells

柯萨奇病毒是引起人类呼吸道、心血管及神经系统感染等疾病的主要病原之一, 病情从轻微的上呼吸道感染到致死性感染不等。病毒性心肌炎及扩张性心肌病近 10 年颇为常见, 而且发病率有不断上升的趋势, 严重危及人民生命健康。目前对病毒感染尚缺乏特异、有效的预防和治疗手段, 研究特异性抗病毒新药具有重要的现实意义。反义核酸技术是利用具有专一顺序的寡聚脱氧核苷酸, 特异阻断目的基因的复制、转录、翻译, 是一种新型的治疗方法, 具有特异、高效、易人工合成等优势。在病毒感染性

疾病、肿瘤和炎症等疾病治疗中具有诱人的应用前景。在国外, 反义核酸治疗 AIDS 和人类巨细胞病毒 (HCMV) 感染已进入临床实验阶段^[1-4]。国内也已经对流感等病毒进行了反义核酸抑制感染的初探^[5, 6]。以下重点探讨我们设计的反义核酸序列对柯萨奇病毒感染 HeLa 细胞的阻断作用。

材料及方法

1. 病毒及细胞: 实验所用病毒株为本室通过 CVB₃ cDNA 感染性克隆, 在转染细胞后获得, 其病毒滴度为 4×10^{10} pfu/ml, 经传代后, -80°C 低温冰箱保存。使用时用无血清 minimum essential medium (MEM) 稀释病毒。HeLa 细胞株由本研究所生化免

疫室提供 细胞培养液为含 5% ~ 10% 新生牛血清的 MEM。

2. 反义核酸 :针对 CVB₃ 病毒基因组的调控序列、结构蛋白、非结构蛋白及非编码区序列等分析 ,设计 6 组不同的反义寡核苷酸 (由上海 Sangon 生物工程公司合成) 序列如下 :

- S_{CB1} 5'AGTATAGGAATAAAATGAAA 3'
- S_{CB2} 5'TTGAGCTCCCATTTTGCTGT 3'
- S_{CB3} 5'CGTGCCTGACCAATGGTGAT 3'
- S_{CB4} 5'CAAACGTCAGCTCCAGGTCG 3'
- S_{CB5} 5'AATGCGCCCGTATTTGTCAT 3'
- S_{CB6} 5'CTCCTGGGGTAGTATTCCT 3'

3. 病毒空斑形成试验 :稀释 CVB₃ 病毒为 10⁻⁴ ~ 10⁻⁸ ,分别加入 6 孔细胞培养板 (细胞数 2 × 10⁶/孔 病毒量 200 μl/孔) 37℃ 5% CO₂ 孵育 1 h ,加入 0.7% 琼脂 (1 ml/孔) ,再孵育 72 h。1% 结晶紫染色 观察结果。

4. 空斑阻断试验 :用浓度为 5 μmol/L 的 S_{CB1}、S_{CB2}、S_{CB3}、S_{CB4}、S_{CB5} 和 S_{CB6} 分别加入 HeLa 细胞培养孔中 ,37℃ 5% CO₂ 孵育 72 h ,固定、染色后观察结果。

5. 病毒致细胞病变效应 (CPE) :稀释病毒使最后细胞的感染量 (MOI) 为 10、1、0.1、0.01 4 种病毒稀释滴度 ,分别加入细胞孔中 ,每孔 200 μl。同时设正常细胞对照孔。病毒感染 1 h 后 ,洗去病毒加正常培养基 37℃ 5% CO₂ 孵育 72 h。观察结果。

6. 反义核酸抑制病毒致细胞病变效应 :将合成的寡核苷酸稀释至 5 μmol/L ,分别加入培养板的细胞孔中 ,每孔 1 ml。37℃ 5% CO₂ 孵育 6 h。

0.01、0.1、1.0、10 MOI 4 种感染量的 CVB₃ 病分别感染 HeLa 细胞 37℃ 5% CO₂ 孵育 1 h ,合成的 6 种寡核苷酸分别稀释至 5 μmol/L ,再加入已感染不同滴度病毒的细胞孔 ,每孔 1 ml 37℃ 5% CO₂ 孵育 72 h ,观察结果。

结 果

一、病毒空斑形成试验

CVB 感染性克隆的构建、转化见文献^[7]。转化后 3 日收获成熟病毒。按表 1 中所列滴度进行不同稀释。待细胞在培养板底面生长近 95% 时 ,进行空斑形成实验。

由表 1 可见 5 × 10⁻⁸ 稀释病毒感染细胞后形成 35 个空斑 ,可计算出此病毒空斑形成单位为 4 ×

10¹⁰ pfu/ml。本实验采用此稀释度的病毒 ,对抑制结果易于量化。

表1 病毒空斑形成试验结果

病毒稀释度	空斑数(均值)
5 × 10 ⁻⁴	>200
5 × 10 ⁻⁵	>200
5 × 10 ⁻⁶	>200
5 × 10 ⁻⁷	150 ~ 200
5 × 10 ⁻⁸	35
阴性对照	0

二、反义核酸阻断病毒空斑形成效果

用病毒空斑形成阻断试验显示反义核酸对病毒感染细胞的抑制。应用所设计的 6 种反义寡核苷酸 (5 μmol/L) 处理 HeLa 细胞 然后用 5 × 10⁻⁸ 稀释度的病毒感染细胞。同时设病毒、正常细胞及非特异寡核苷酸 (random) 对照。结果见表 2。

表2 5 × 10⁻⁸ 稀释度病毒空斑阻断试验结果

反义核酸 (5 μmol/L)	空斑数(均值)
正常细胞对照孔	0
S _{CB1}	1
S _{CB2}	5
S _{CB3}	12
S _{CB4}	1
S _{CB5}	6
S _{CB6}	3
random	25
病毒感染对照孔	35

三、病毒致细胞病变效应

根据每个培养孔细胞数为 2 × 10⁶ ,及病毒空斑形成单位 4 × 10¹⁰ pfu/ml ,可算出从原病毒液中取 0.5 μl 稀释到 200 μl 其病毒量为 2 × 10⁷ pfu/ml ,即感染复数为 10 MOI。继续稀释病毒 ,用 4 种不同感染量的病毒感染 HeLa 细胞 培养 72 h 后 细胞存活情况见表 3。

表3 不同滴度病毒感染细胞情况

病毒感染量 (MOI)	活细胞量
0.01	少许
0.1	无
1	无
10	无
无病毒细胞阴性对照	全部

由表 3 可见 ,当病毒 MOI 为 0.01 时 ,病毒 RNA 进入 HeLa 细胞仍有部分存活 ,MOI 为 0.1 时 ,培养 72 h 细胞几乎全部死亡。

四、反义核酸对病毒致细胞病变效应的抑制

观察应用反义核酸后抑制病毒感染细胞的效果。由于柯萨奇病毒在细胞中繁殖,仅通过裂解细胞而感染邻近细胞,因此,通过观察细胞病变、形态和死亡,可观察细胞的感染程度。我们用浓度是 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 6 种反义核酸分别对 0.01、0.1、1.0、10 MOI 感染量的病毒所感染的细胞进行实验,观察其保护细胞的效果,结果见图 1。

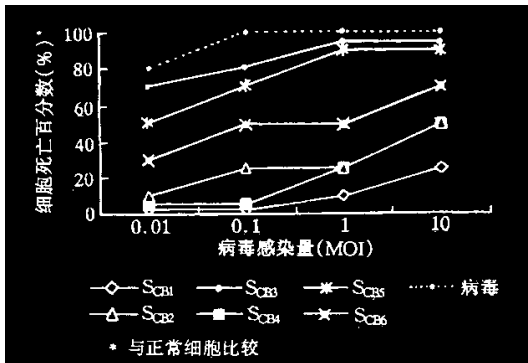


图1 6种反义核酸的抗病毒效应

以上结果显示,根据不同区域设计的反义核酸对病毒的抑制能力不同,其中 S_{CB1} 、 S_{CB2} 、 S_{CB4} 和 S_{CB6} 均显现出对病毒感染的抑制作用,结果与空斑形成抑制实验显示出一致性。 S_{CB1} 的抑制效果 $>90\%$, S_{CB2} 也达到 75% , S_{CB4} 在 0.1 MOI 时显示出 $>90\%$ 的抑制效果,而在 1.0 和 10 MOI 时也显示出 75% 和 50% 的抑制率, S_{CB6} 抑制率为 50% 。同时我们设立正常细胞对照组,设随机合成的寡核苷酸为非特异性对照,结果未发现任何保护作用;此外,反义核酸对细胞毒性试验的浓度设在 $5 \mu\text{mol/L}$,其细胞生长结果与单纯细胞对照组相比未出现明显的细胞损伤及影响细胞生长的现象,证明了反义核酸的应用对细胞生长没有明显的毒性作用。

讨 论

反义核酸进行抗病毒治疗,作用原理主要为阻断病毒基因组的转录与翻译。从核苷酸水平上寻找抗病毒治疗的方法,是抗病毒治疗的最佳途径之一。

柯萨奇病毒基因组为正链、单链 RNA,大约由 7 400 bp 组成。CVB RNA 基因组的调控序列、结构蛋白、非结构蛋白及非编码区序列已基本确定清楚^[7],本实验在对 CVB₃ 较深入的分子生物学研究

与免疫学研究基础上,针对病毒基因组不同功能区设计出 6 条反义核酸序列,在感染细胞模型上进行研究,筛选出特异性抑制 CVB₃ 感染细胞的反义核酸序列。

实验结果显示,反义核酸有明显的抑制病毒感染细胞的作用,但针对病毒不同区域所产生的效果也不同。由表 2 可见,在病毒空斑阻断试验中, S_{CB1} 抑制病毒感染的能力较强, S_{CB4} 、 S_{CB6} 和 S_{CB2} 次之, S_{CB5} 、 S_{CB3} 的抑制病毒能力最差。在反义核酸对病毒致细胞病变效应的影响中,当病毒的感染量为 0.01、0.1 MOI 时 S_{CB1} 和 S_{CB4} 抑制病毒效果很好,无死亡;随病毒感染量逐渐增加至 10 MOI, S_{CB1} 对病毒仍有较好的抑制作用,而 S_{CB4} 则随病毒感染量的增加,抑制病毒的效果逐渐减弱,有一部分细胞出现死亡。 S_{CB2} 、 S_{CB6} 抗病毒效果稍差,当病毒感染量为 0.01 个 MOI 时有少许细胞死亡,病毒滴度增加时,死亡细胞随之增加。 S_{CB3} 和 S_{CB5} 对病毒基本无抑制作用,当病毒感染量为 1 MOI 时,细胞几乎全部死亡。

根据上述实验结果, S_{CB1} 对感染 HeLa 细胞的 CVB₃ 抑制作用最好, S_{CB2} 、 S_{CB4} 和 S_{CB6} 的抗病毒作用稍差,而 S_{CB3} 和 S_{CB5} 以及非特异性对照序列对 CVB₃ 病毒基本没有作用。这与作用部位有关,我们准备在不同病毒复制水平及量效关系上进一步研究。此外,我们在反义核酸对细胞的毒性观察中,未见明显的细胞损伤,提示了反义核酸的使用安全性。

参 考 文 献

- Stein CA, Chen YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agent - Is the bullet really magical? Science, 1993, 261:1004-1012.
- Wagner RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. Nature, 1994, 372:333-335.
- Whitton JL. Antisense treatment of viral infection. Advances in Virus Research, 1994, 44:267-303.
- Nichols WG, Boeckh M. Recent advance in the therapy and prevention of CMV infections. J Clin Virol, 2000, 16:25-40.
- 裘慕绥.反义核酸对小鼠腹水瘤病毒(反转录病毒)的抑制作用.中国科学 B 辑, 1991, 6:602-608.
- 陈忠斌,王升启,朱宝珍,等.硫代反义寡核苷酸在细胞培养内抗甲型流感病毒活性.病毒学报, 1998, 14:193-198.
- Zhewei Liu, Carthy CM, Cheung P, et al. Structural and functional analysis of the 5' untranslated region of coxsackievirus B₃ RNA: In vivo translational and infectivity studies of full-length mutants. Virology, 1999, 265:206-217.

(收稿日期 2000-03-17)